

Pós-Doutorado

Relatório Final

**Influência da empagliflozina no miocárdio de ratos com insuficiência
cardíaca induzida por estenose aórtica**

Beneficiário: Luana Urbano Pagan

Supervisor: Prof. Katashi Okoshi

Julho

2024

Título do Projeto: **Influência da empagliflozina no miocárdio de ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica**

Pesquisador responsável: *Luana Urbano Pagan*

Instituição sede: **Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp**

Equipe de pesquisa:

João Pedro Gallo de Oliveira – Graduação – Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Anna Clara Consorti dos Santos - Mestrado - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Patricia Aparecida Borim – Doutorado - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Lidiane Moreira de Souza - Doutorado - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Gustavo Augusto Ferreira Mota – Pós-Doutorado - Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Mariana Gatto – Pós- doutorado - Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Processo FAPESP: 2018/07048-2

Vigência do projeto: 01/07/2020 a 30/06/2024

Luana Urbano Pagan
Bolsista

Katashi Okoshi
Supervisor

Descrição e avaliação do apoio institucional recebido no período

A Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp contribuiu de forma significativa com as atividades de pesquisa desenvolvidas relacionadas ao projeto em questão, fornecendo materiais e apoio técnico para a padronização da cultura celular.

Aplicação dos Recursos da Reserva Técnica

Participação no Congresso Europeu de Cardiologia e realização de visita técnica/estágio na Universidade do Porto, departamento de cirurgia e fisiologia.

Atividades realizadas no período

Estágio no Exterior

Período: 01/08/2022 – 30/07/2023 – Bolsa BEPE – FAPESP (proc. 2021/13027-0)

Local: Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol - Heart Failure and Cardiac Regeneration (ICREC) - Espanha

Projeto: GMP mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles cells for cardiac tissue repair after myocardial infarction

Supervisora no exterior: Carolina Gálvez-Montón

Transferência de Conhecimentos: A bolsista apresentou uma aula expositiva para o grupo de pesquisa, alunos de outros grupos e técnicos da Faculdade de Medicina, abordando a preparação de amostras histológicas, além de técnicas para a cultura de células AC16. Ela também apresentou materiais de histologia que poderão ser utilizados pelo grupo de pesquisa em futuros projetos e disponibilizou os protocolos aprendidos durante o estágio.

Estágio no Exterior/ Visita técnica

Período: 01/04/2023 – 28/04/2023

Local: Departamento de Cirurgia e Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Grupo de Pesquisa: Unidade de Investigação Cardiovascular – UniC

Professora responsável: Inês Falcão Pires

Lista de publicações

Souza, L. M.; Gomes, M. J.; Brandao, B. B.; **Pagan, L. U.**; Gatto, M.; Damatto, F.; Rodrigues, E. A.; Pontes T. H. D.; Borim, P. A.; Fernandes, Ana A. H.; Murata, G. M.; Zornoff, L. A. M.; Azevedo, P. S.; Okoshi K.; Okoshi M. P. Effects of resistance exercise on slow-twitch soleus muscle of infarcted rats. *Antioxidants*, v. 12, p. 01, 2023.

Tanni, S.; Wehrmeister, F.; Prudente, R.; Damatto, F.; Breda Neto, C.; Oliveira, L.; **Pagan, L.**; Gatto, M.; Vieira, L.; Coelho, L.; Rezende, D.; Machado, L.; Mota, G.; Gaiato, M.; Santaella, F.; Campos, E.; Franco, E.; Callegari, M.; Okoshi, M. P.; Weinreich, U. Efficacy of BREATHOX® device inhalation on acute symptoms associated with COVID-19 (BREATH Study): A randomized pilot clinical trial. *Journal of Clinical Medicine*, v. 12, p. 6075, 2023.

Rodrigues, E. A.; Lima, A. R. R.; Gomes, M. J.; Souza, L. M. Pontes, Thierres H. D.; **Pagan, L. U.**; Murata, G. M.; Damatto, F. C.; Carvalho Depira, I.; Rego, A. B. G. C.; Reyes, D. R. A.; Zornoff, L. A. M.; Okoshi, K.; Okoshi, M. P. Influence of isolated resistance exercise on cardiac remodeling, myocardial oxidative stress, and metabolism in infarcted rats. *Antioxidants*, v. 12, p. 896, 2023.

Mota, G. A. F.; Gatto, M.; **Pagan, L. U.**; Tanni, Suzana Erico; Okoshi, Marina Politi. Diabetes mellitus, physical exercise and heart rate variability. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 120, p. 1-2, 2023.

Pagan, L. U.; Gatto, M.; Martinez, P. F.; Okoshi, K.; Okoshi, M. P. Biomarkers in cardiovascular disease: the role of fetuin-A. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 118, p. 22-23, 2022.

Pagan, L. U.; Gomes, M. J.; Gatto, M.; Mota, G. A. F.; Okoshi, K.; Okoshi, M. P. The role of oxidative stress in the aging heart. *Antioxidants*, v. 11, p. 336, 2022.

Rosa, C. M.; Campos, D. H. S.; Reyes, D. R. A.; Damatto, F. C.; Kurosaki, L. Y.; **Pagan, L. U.**; Gomes, M. J.; Corrêa, C. R.; Fernandes, A. A. H.; Okoshi, M. P.; Okoshi, K. Effects of the SGLT2 inhibition on cardiac remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats, a model of type 1 diabetes mellitus. *Antioxidants*, v. 11, p. 982, 2022.

Tardelli, L.P.; Duchatsch, F.; Herrera, N. A.; Ruiz, T. F. R.; **Pagan, L. U.**; Vicentini, C. A.; Okoshi, K.; Amaral, S. L. Benefits of combined exercise training on arterial stiffness and blood pressure in spontaneously hypertensive rats treated or not with dexamethasone. *Frontiers in Physiology*, v. 13, p. 1, 2022.

Trabalhos publicados em anais de eventos (autoria e co-autoria)

Pagan, L. U.; Gomes, M. J.; Damatto, F. C.; Oliveira, J. P. G.; Gatto, M.; Souza, L. M.; Santos, A. C. C.; Borim, P. A.; Rodrigues, E. A.; Mota, Gustavo A F; Campos, D. H. S.; Murata, G. M.; Polegato, Bertha F.; Okoshi, M. P.; Okoshi K. Effects of SGLT2 inhibition on cardiac remodeling and heart failure development in rats with aortic stenosis. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso). Resumo de maior pontuação aceito do Brasil, no European Society of Cardiology Congress (Amsterdam). Publicação: *European Heart Journal* 2023;44:1.

Courageux, Y.; Monguio-Tortajada, M.; Lopez-Fernandez, A.; Morini, S.; Soler-Botija, C.; Schoch, L.; Prat-Vidal, C.; **Pagan, L. U.**; Rodriguez, L.; Gastelurrutia, P.; Galvez-Monton, C.; Bayes-Genis, A.; Vives, J.; Querol, S.; Roura, S. Large-scale manufacturing of GMP-grade Wharton's jelly mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles: in vitro characterization and in vivo assessment for cardiac regeneration. In: HFA Winter Research Meeting, 2024, Niza. HFA Winter Research Meeting on Translational Heart Failure 2024 In collaboration with the ESC Working Group on Myocardial Function, 2024.

Courageux, Y.; Monguio-Tortajada, M.; Lopez-Fernandez, A.; Morini, S.; Soler-Botija, C.; Prat-Vidal, C.; **Pagan, L. U.**; Schoch, L.; Rodriguez, L.; Gastelurrutia, P.; Galvez-

Monton, C.; Bayes-Genis, A.; Vives, J.; Querol, S.; Roura, S. Manufacturing of Wharton's jelly mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles for clinical application. In: 1st MOVE - Mobility for Visicles Ressearch in Europe - Symposium, 2023, Malaga. MOVE Simposium - Printable Program (With Abstracts), 2023. p. 57.

Gatto, M.; Mota, G. A. F.; Borim, P. A.; Santos, A. C. C.; **Pagan, L. U.**; Silva, R. C. P. F.; Maranhao, R. C.; Zornoff, L. A. M.; Okoshi K.; Okoshi, M. P. Metotrexato veiculado por nanopartículas diminui a expressão do inflamassoma a NLRP4 no coração de ratos infartados. In: 43 Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2023, São Paulo. Suplemento da Revista do Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2023. v. 33. p. 154.

Mota, G. A. F.; Souza S. L.; Vileigas, D. F.; Silva, V. L.; Sant'ana, P. G.; **Pagan, L. U.**; Gregolin, C. S.; Costa, L. C. S.; Souza, D. M.; Bazan, S. G. Z.; Buzalaf, M. A. R.; Santos, L. D.; Okoshi, M. P.; Gatto, M.; Cicogna, A. C. Panorama das alterações do proteoma cardíaco em ratos com estenose aórtica submetidos ao treinamento físico aeróbio. In: XX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2022, Curitiba. Anais do XX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2022.

Oliveira, J. P. G.; Borim, P. A.; Damatto, Felipe C.; Oliveira, Leiliane R. S.; Mota, Gustavo A F; Campos, Dijon H. S.; Okoshi, M. P.; Okoshi K.; **Pagan, L. U.** Efeitos da empagliflozina no coração de ratos com insuficiência cardíaca. In: 42º Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2022, São Paulo. Suplemento da Revista do Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2022.

Souza, L. M.; Brandao, B. B.; **Pagan, L. U.**; Gatto, M.; Rodrigues, E. A.; Borim, P. A.; Murata, G. M.; Zornoff, L. A. M.; Okoshi K.; Okoshi, M. P. Sodium glucose co-transporter 2 inhibition prevents muscle energy metabolism changes in infarcted rats. In: ESC Congress, 2022, Barcelona. European Heart Journal, 2022. v. 43. p. 1046.

Rodrigues, E. A.; Souza, L. M.; Pontes T. H. D.; Gomes, M. J.; **Pagan, L. U.**; Murata, G. M.; Damatto, F.; Rego, A. B. G. C.; Lima A. R. R.; Reyes, D. R. A.; Zornoff, L. A. M.; Okoshi K.; Okoshi, M. P. Effects of resistance exercise in the cardiac remodeling of myocardial infarction rats. In: European Society of Cardiology Congress, 2022, Barcelona. European Heart Journal, 2022. v. 43. p. 2444.

Damatto, F.; Paschoareli, G. L.; Rosa, C. M.; Gomes, M. J.; **Pagan, L. U.**; Damatto R. L.; Rodrigues, E. A.; Pontes T. H. D.; Reyes, D. R. A.; Cezar, M. D. M.; Oliveira, L. R. S. dos; Zornoff, L. A. M.; Rego, A. B. G. C.; Okoshi, M. P.; Okoshi K. Influence of the SGLT2 inhibitor empagliflozin on post myocardial infarction rat hearts. In: European Society of Cardiology Congress, 2022, Barcelona. European Heart Journal, 2022. v. 43. p. 1115.

Orientações

Co-orientação de Doutorado:

Projeto: Influência da suplementação de ácidos graxos ômega 3 na estrutura, regulação e funcionamento vascular de ratos tratados cronicamente com doxorubicina

Aluna: Marina Gaiato Monte

Em andamento

Co-orientação de Mestrado:

Projeto: Efeitos do exercício físico intervalado no remodelamento cardíaco e nas vias IGF-1/PI3K/Akt E MAPK de ratos espontaneamente hipertensos

Aluna: Leiliane Rodrigues dos Santos Oliveira

Conclusão: 2022

Orientação de Iniciação Científica:

Projeto: Influência da empagliflozina no miocárdio de ratos com insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica

Aluno: João Pedro Gallo de Oliveira - Processo FAPESP 2021/04117-6

Período de orientação: 01/07/2021 – 30/06/2022

Conclusão: 30/06/2023

Participação em Banca - Mestrado

Oliveira Junior, S. A.; **Pagan, L. U.**; Barbosa, C. M.; Taciro, C.. Participação em banca de Richard Nicolas Marques Caputi. Influência da suplementação com creatina e treinamento físico intervalado sobre marcadores metabólicos e indicadores de remodelação muscular esquelética em ratos saudáveis. 2023. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Participação em Bancas - Doutorado

Polegato, B. F.; Okoshi, M. P.; **Pagan, L. U.**; Roscani, M. G.; Rezende, M. A. M. L.. Participação em banca de Ana Paula Dantas Ribeiro. Influência do suco de laranja na atenuação da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em ratos: papel da mitocôndria cardíaca e da microbiota intestinal. 2023. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Okoshi, M. P.; **Pagan, L. U.**; Zanati, S. G.; Pacagnelli, F. L.; Cezar, M. D. M.. Participação em banca de Éder Anderson Rodrigues. A influência da dapagliflozina na remodelação cardíaca, função miocárdica e metaboloma em ratos com diabetes mellitus tipo 1. 2023. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Revisor de Periódicos “ad hoc”

- Arquivos Brasileiros de Cardiologia
- BMC Complementary Medicine and Therapies
- Biomedicine & Pharmacotherapy
- Frontiers in Pharmacology
- Free Radical Biology & Medicine
- Journal of Sport and Health Science
- iScience
- Medical Science Monitor
- Scientific Reports – Nature

- Open Medicine
- Nutrire

Artigos revisados no período: 4

RESUMO DO PROJETO

Introdução: A insuficiência cardíaca (IC) caracteriza-se, clinicamente, por redução da capacidade para exercícios físicos e atividades cotidianas. A IC pode ser decorrente de doenças tais como hipertensão arterial, infarto do miocárdio, valvulopatias e miocardiopatias. Sobrecargas hemodinâmicas crônicas produzidas por essas doenças induzem alterações gênicas, moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam clinicamente como modificações no tamanho, forma e função do coração, cujo processo é denominado remodelamento cardíaco. Essas sobrecargas podem gerar mudanças na arquitetura do colágeno, favorecer a fibrose, bem como o desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante. Alterações dessas vias contribuem para o processo de remodelamento cardíaco, levando a piora do quadro clínico da IC. Devido à elevada morbidade e mortalidade por IC, há grande interesse no desenvolvimento de novos medicamentos para atenuar o remodelamento cardíaco que ocorre durante a progressão da doença. O inibidor da proteína cotransportadora de sódio-glicose tipo 2 (SGLT2), utilizado no tratamento do diabetes mellitus, tem demonstrado efeito cardioprotetor, porém os mecanismos pelos quais promove benefícios ao coração ainda não estão esclarecidos. Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar a influência do inibidor da SGLT2 empagliflozina na inflamação, hipertrofia, estresse oxidativo e metabolismo energético no miocárdio de ratos com IC induzida por estenose aórtica; e observar os efeitos na situação de estresse oxidativo em mioblastos cultivados em culturas. **Métodos:** Após 18 semanas de indução de estenose aórtica, foram constituídos quatro grupos experimentais de ratos Wistar machos: sham (Sham, n=15); sham + empagliflozina (Sham-Emp, n=15); estenose aórtica (EAO, n=25); estenose aórtica + empagliflozina (EAO-Emp, n=25). Os ratos pertencentes aos grupos Sham-Emp e EAO-Emp receberam, diariamente, empagliflozina na concentração de 10 mg/kg/dia adicionada à ração, durante 8 semanas. A avaliação estrutural e funcional *in vivo* do coração foi realizada por ecocardiograma. Amostras de tecido do ventrículo esquerdo foram obtidas para análises bioquímicas, histológicas e moleculares. *In vitro*, células H9C2 foram induzidas ao estresse oxidativo por H₂O₂ e tratadas com empagliflozina. Após o tratamento, foram submetidas a análises de imunofluorescência (Nfr2) e Western blotting (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, ERK, p38, JNK, p65 e IκB). As comparações entre os grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Bonferroni (distribuição normal), ou o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn (distribuição não normal). Os resultados são discutidos no nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Para a constituição dos grupos nesse estudo foram utilizados 200 ratos Wistar (animais normotensos). Durante o procedimento de cirurgia de estenose aórtica e no período de 18 semanas pós-cirurgia, 115 animais morreram representando mortalidade de 57,5% dos animais. O período de tratamento foi iniciado com 85 animais, divididos em sham (Sham, n=15), sham + empagliflozina (Sham-Emp, n=16), estenose aórtica (EAO, n=27) e estenose aórtica + empagliflozina (EAO-Emp, n=27). Ao final do experimento, os grupos controles não apresentaram mortalidade de animais. O grupo EAO apresentou mortalidade de 9 animais e o grupo EAO-Emp de 3 animais. Dois animais do grupo EAO foram excluídos, pois não tinham estenose da aorta.

A frequência de sinais de insuficiência cardíaca (IC) apresentada pelos grupos está apresentada na Tabela 1. O grupo EAO apresentou maior porcentagem de ascite e congestão hepática em comparação ao grupo EAO-Emp. Os animais controles não apresentaram nenhum sinal de IC. Esses dados sugerem possível efeito protetor da empagliflozina em reduzir a frequência de sinais de IC.

Tabela 1: Frequência de sinais de insuficiência cardíaca (IC)

Sinais de IC	EAO (n=16)	EAO-Emp (n=24)
Ascite (%)	87,5	29,2*
Derrame pleural (%)	53,3	33,3
Taquipneia (%)	62,5	37,5
Trombo em átrios (%)	56,3	50,0
Congestão hepática (%)	62,5	20,8*

Dados expressos em porcentagem (%). EAO: grupo de animais com estenose aórtica. EAO-Emp: grupo de animais com estenose aórtica tratados com empagliflozina. *: $p < 0,05$ vs. EAO (teste de Goodman).

Avaliação Ecocardiográfica

O ecocardiograma foi utilizado para avaliar as variáveis estruturais e funcionais do coração. O exame foi realizado antes do início do tratamento com empagliflozina para assegurar distribuição homogênea dos ratos entre os grupos. Os dados iniciais estão descritos nas Tabelas 2, 3 e 4. Os parâmetros estruturais (Tabela 2) mostram aumento das variáveis DDVE, EDPP, AO, AE, AE/AO, DDVE/PC, AE/PC, MVE, IMVE, Esp. Rel. VE e diminuição do PC nos grupos com estenose em comparação com os respectivos controles. Nas variáveis funcionais (Tabelas 3 e 4) os animais com estenose apresentaram comprometimento da função sistólica do ventrículo esquerdo em relação aos seus respectivos controles (variáveis VEPP e S' média), e aumento da E mitral, E/A e

E/E'média e diminuição da A mitral e do TRIV em relação aos respectivos controles, sugerindo comprometimento também da função diastólica.

Os dados expressos nessas tabelas mostram que cirurgia de estenose aórtica foi eficaz em causar alterações nos parâmetros estruturais e funcionais do coração, sendo considerado um importante modelo para o estudo da IC.

Tabela 2: Análise ecocardiográfica inicial dos parâmetros estruturais do coração

Variáveis	Sham (n=15)	Sham-Emp (n=16)	EAO (n=26)	EAO-Emp (n=25)
PC (g)	463 ± 53	457 ± 44	418 ± 31*	418 ± 50#
FC (bpm)	269 ± 17	271 ± 21	279 ± 31	272 ± 28
DDVE (mm)	8,16 ± 0,62	8,21 ± 0,50	8,73 ± 0,99*	8,75 ± 0,85#
DSVE (mm)	4,15 (3,69 - 4,48)	4,15 (3,80 - 4,47)	4,63 (3,94 - 5,16)	4,77 (3,55 - 5,56)
EDPP (mm)	1,41 (1,39 - 1,47)	1,45 (1,41 - 1,49)	2,28 (2,16 - 2,42)*	2,28 (2,16 - 2,39)#
AO (mm)	3,88 ± 0,18	3,94 ± 0,12	4,01 ± 0,20*	4,10 ± 0,20#
AE (mm)	5,47 (5,26 - 5,69)	5,47 (5,27 - 5,69)	8,61 (7,87 - 9,20)*	8,54 (7,45 - 8,96)#
AE/AO	1,41 (1,37 - 1,45)	1,43 (1,33 - 1,45)	2,12 (1,99 - 2,32)*	2,06 (1,79 - 2,23)#
DDVE/PC (mm/kg)	17,7 ± 1,69	18,1 ± 1,51	21,0 ± 2,82*	21,2 ± 3,37#
AE/PC (mm/kg)	12,0 ± 1,06	12,2 ± 1,10	20,1 ± 3,06*	20,0 ± 3,74#
MVE (g)	0,79 (0,70 - 0,90)	0,86 (0,82 - 0,91)	1,80 (1,51 - 2,05)*	1,76 (1,51 - 2,02)#
IMVE (g/kg)	1,77 (1,62 - 1,99)	1,87 (1,73 - 1,97)	4,27 (3,68 - 4,97)*	4,05 (3,55 - 4,98)#
Esp. Rel. VE	0,34 (0,34 - 0,37)	0,35 (0,34 - 0,37)	0,52 (0,50 - 0,55)*	0,54 (0,49 - 0,57)#

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; MVE: massa do VE; IMVE: MVE/PC; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE. *: p<0,05 vs. Sham; #: p<0,05 vs. Sham-Emp (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 3: Avaliação da função sistólica e do desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo por ecocardiograma no início do experimento

Variáveis	Sham (n=15)	Sham-Emp (n=16)	EAO (n=26)	EAO-Emp (n=25)
% Enc. Endo	50,2 (47,4 - 52,7)	49,9 (46,1 - 53,5)	48,4 (43,6 - 51,8)	45,1 (39,8 - 54,1)
VEPP (mm/s)	41,9 (37,3 - 44,9)	41,7 (37,6 - 45,2)	28,9 (25,0 - 32,9)*	29,3 (26,1 - 36,4)#
S' média (cm/s)	3,30 (3,00 - 3,40)	3,45 (3,09 - 3,50)	2,70 (2,35 - 2,95)*	2,65 (2,35 - 2,95)#
Índice de Tei	0,45 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,46 ± 0,10	0,43 ± 0,07

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina; % Enc. Endo: % de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; S' média: média das velocidades máximas de deslocamento das paredes lateral e septal do anel mitral avaliada por Doppler tissular; Índice de Tei: índice de performance miocárdica. *: p<0,05 vs. Sham; #: p<0,05 vs. Sham-Emp (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 4: Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma no início do experimento

Variáveis	Sham (n=15)	Sham-Emp (n=16)	EAO (n=26)	EAO-Emp (n=25)
E mitral (cm/s)	78,7 ± 5,79	78,2 ± 7,53	119 ± 26,3*	113 ± 27,2#
A mitral (cm/s)	45,0 (38,0 - 47,0)	47,0 (40,2 - 52,0)	24,0 (20,0 - 39,0)	24,0 (19,0 - 47,7)#
E/A	1,87 (1,68 - 2,08)	1,69 (1,49 - 1,93)	5,00 (2,57 - 5,97)*	5,68 (1,87 - 7,26)#
TRIV (ms)	26,0 (24,0 - 26,0)	26,0 (24,0 - 27,5)	19,0 (18,0 - 22,5)*	20,0 (18,0 - 26,0)#
E' média (cm/s)	3,83 ± 0,43	3,89 ± 0,33	3,86 ± 0,72	3,90 ± 0,71
E' lateral (cm/s)	3,85 ± 0,44	3,88 ± 0,47	4,17 ± 0,97	4,18 ± 1,04
E' septal (cm/s)	3,81 ± 0,62	3,90 ± 0,33	3,56 ± 0,62	3,62 ± 0,69
E/E' média	20,0 (19,0 - 22,4)	20,0 (18,9 - 22,3)	30,0 (26,9 - 35,5)*	27,9 (24,9 - 32,2)#
A' média (cm/s)	2,85 (2,65 - 3,75)	2,95 (2,72 - 3,22)	2,50 (2,35 - 2,95)	2,65 (2,50 - 3,65)
A' lateral (cm/s)	2,90 (2,80 - 3,80)	3,10 (2,90 - 3,77)	2,55 (2,12 - 3,45)	3,10 (2,55 - 4,20)
A' septal (cm/s)	2,70 (2,40 - 3,70)	2,80 (2,42 - 3,12)	2,40 (2,20 - 3,20)	2,70 (2,10 - 3,40)
E' média/A' média	1,29 ± 0,32	1,30 ± 0,27	1,54 ± 0,51	1,37 ± 0,45

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina; E: pico de velocidade do fluxo de enchimento inicial; A: pico de velocidade do fluxo de enchimento tardio; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E': pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; A': pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral. *: p<0,05 vs. Sham; #: p<0,05 vs. Sham-Emp (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

A avaliação ecocardiográfica realizada ao final do período experimental está apresentada nas Tabelas 5, 6 e 7. Na Tabela 5 são apresentadas as variáveis estruturais do coração. Os grupos com estenose aórtica apresentaram maior DDVE, DSVE, EDPP, AE, AE/AO, DDVE/PC, AE/PC, MVE, IMVE e espessura relativa do VE em comparação aos respectivos controles. O PC foi menor no grupo Sham-Emp em comparação com o grupo Sham. O grupo EAO-Emp apresentou menores valores de DDVE, DSVE, AE, DDVE/PC, MVE e IMVE em comparação com o grupo EAO. As variáveis FC e AO não apresentaram diferença entre os grupos.

A Tabela 6 apresenta os dados da função sistólica do VE. Os grupos com estenose aórtica apresentaram valores menores das variáveis % Enc. Endo, VEPP e S' média em comparação aos respectivos controles. O índice de Tei não apresentou diferença entre os grupos. O S' média foi maior no grupo EAO-Emp em comparação com o grupo EAO.

A Tabela 7 mostra os dados obtidos da avaliação da função diastólica do VE. Os grupos com estenose aórtica apresentaram valores maiores das variáveis E mitral, E/A e E/E' média, e menores das variáveis A mitral, TRIV, A' média, A' lateral e A' septal em comparação aos respectivos controles. O grupo EAO apresentou menor valor da variável E' septal em comparação com o controle. O grupo EAO-Emp apresentou maior valor das variáveis TRIV, A' média e A' septal, e menor valor da variável E/E' média em comparação com o grupo EAO. As variáveis E' média, E' lateral e a relação E' média/A' média não apresentaram diferenças entre os grupos.

Os animais doentes que receberam a empagliflozina demonstraram ter melhora nos parâmetros estruturais, tanto em valores absolutos como normalizados pelo peso corporal. Além disso, houve melhora importante na função diastólica avaliada pelo Doppler tissular.

Tabela 5: Análise ecocardiográfica final dos parâmetros estruturais do coração

Variáveis	Sham (n=14)	Sham-Emp (n=14)	EAO (n=16)	EAO-Emp (n=17)
PC (g)	509 ± 67	467 ± 44*	452 ± 29*	454 ± 35
FC (bpm)	258 ± 23	246 ± 32	246 ± 21	253 ± 32
DDVE (mm)	8,39 ± 0,57	8,25 ± 0,38	9,80 ± 0,53*	9,08 ± 0,87 [#]
DSVE (mm)	4,24 ± 0,68	4,19 ± 0,57	5,72 ± 0,74*	5,09 ± 1,08 [#]
EDPP (mm)	1,37 (1,37 - 1,44)	1,41 (1,37 - 1,43)	2,30 (2,20 - 2,44)*	2,16 (2,12 - 2,26) [#]
AO (mm)	4,01 (3,99 - 4,22)	4,10 (3,94 - 4,17)	4,10 (3,94 - 4,15)	3,94 (3,94 - 4,13)
AE (mm)	5,68 ± 0,40	5,64 ± 0,32	9,67 ± 1,00*	8,97 ± 1,36 [#]
AE/AO	1,39 ± 0,09	1,38 ± 0,09	2,39 ± 0,26*	2,23 ± 0,36 [#]
DDVE/PC (mm/kg)	16,7 ± 2,36	17,8 ± 1,79	21,8 ± 1,77*	20,1 ± 1,42 [#]
AE/PC (mm/kg)	11,3 ± 1,35	12,1 ± 1,05	21,4 ± 2,34*	19,9 ± 3,41 [#]
MVE (g)	0,85 ± 0,11	0,82 ± 0,07	2,19 ± 0,27*	1,76 ± 0,34 [#]
IMVE (g/kg)	1,68 ± 0,25	1,77 ± 0,24	4,86 ± 0,70*	3,90 ± 0,76 [#]
Esp. Rel. VE	0,33 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,48 ± 0,03*	0,48 ± 0,04 [#]

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; MVE: massa do VE; IMVE: MVE/PC; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE. *: p<0,05 vs. Sham; #: p<0,05 vs. Sham-Emp; [§]: p<0,05 vs. EAO (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 6: Avaliação da função sistólica e do desempenho miocárdico do ventrículo esquerdo por ecocardiograma ao final do experimento

Variáveis	Sham (n=14)	Sham-Emp (n=14)	EAO (n=16)	EAO-Emp (n=17)
% Enc. Endo	49,7 ± 5,77	49,3 ± 5,33	41,8 ± 5,30*	44,4 ± 7,77 [#]
VEPP (mm/s)	41,5 ± 5,33	39,4 ± 4,17	26,9 ± 3,32*	27,2 ± 4,61 [#]
Índice de Tei	0,48 ± 0,06	0,48 ± 0,07	0,54 ± 0,09	0,50 ± 0,11
S' média (cm/s)	3,42 ± 0,31	3,12 ± 0,44*	2,42 ± 0,34*	2,68 ± 0,30 [#]

Valores expressos em média e desvio padrão. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina; % Enc. Endo: % de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Índice de Tei: índice de performance miocárdica; S' média: média das velocidades máximas de deslocamento das paredes lateral e septal do anel mitral avaliada por Doppler tissular. *: p<0,05 vs. Sham; #: p<0,05 vs. Sham-Emp; [§]: p<0,05 vs. EAO (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 7: Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma ao final do experimento

Variáveis	Sham (n=14)	Sham-Emp (n=14)	EAO (n=16)	EAO-Emp (n=17)
E mitral (cm/s)	81,0 (72,0 - 86,8)	77,0 (71,6 - 81,8)	133 (123 - 137)*	118 (103 - 135) [#]
A mitral (cm/s)	47,5 (42,5 - 55,5)	51,5 (39,3 - 58,3)	17,0 (15,3 - 24,8)*	17,0 (15,0 - 34,0) [#]
E/A	1,56 (1,45 - 1,99)	1,59 (1,31 - 1,91)	7,64 (5,39 - 9,10)*	6,77 (3,03 - 9,33) [#]
TRIV (ms)	28,6 ± 2,28	29,8 ± 3,04	18,9 ± 2,59*	22,9 ± 5,02 ^{#§}
E' média (cm/s)	3,42 ± 0,31	3,12 ± 0,44	2,42 ± 0,34	2,68 ± 0,30
E' lateral (cm/s)	3,98 ± 0,37	3,79 ± 0,58	4,19 ± 0,68	4,04 ± 1,10
E' septal (cm/s)	4,24 ± 0,57	3,99 ± 0,75	3,48 ± 0,64*	3,75 ± 0,85
E/E' média	19,6 ± 2,76	19,9 ± 2,92	35,0 ± 7,15*	30,7 ± 4,84 ^{#§}
A' média (cm/s)	3,47 ± 0,45	3,63 ± 0,80	2,45 ± 0,41*	2,98 ± 0,75 ^{#§}
A' lateral (cm/s)	3,81 ± 0,62	3,59 ± 0,88	2,73 ± 0,68*	3,04 ± 0,76 [#]
A' septal (cm/s)	3,42 ± 0,55	3,66 ± 0,93	2,16 ± 0,50*	2,92 ± 0,89 ^{#§}
E' média/ A' média	1,30 (1,04 - 1,34)	1,08 (0,92 - 1,29)	1,57 (1,30 - 1,89)	1,35 (0,94 - 1,80)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina; E: pico de velocidade do fluxo de enchimento inicial; A: pico de velocidade do fluxo de enchimento tardio; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E': pico de velocidade de deslocamento diastólico inicial do anel mitral; A': pico de velocidade de deslocamento diastólico tardio do anel mitral. *: p<0,05 vs. Sham; #: p<0,05 vs. Sham-Emp; §: p<0,05 vs. EAO (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Parâmetros corporais

A Tabela 8 mostra as variáveis corporais e cardíacas dos quatro grupos. As variáveis VE, VE/PC, VD, VD/PC, átrios, átrios/PC, e as relações de peso úmido e peso seco do VE, VD, átrios e fígado foram maiores nos grupos com estenose aórtica em comparação com os respectivos controles. O grupo EAO-Emp apresentou menor valor da relação do peso úmido e peso seco do VE em comparação com o grupo EAO. A relação peso úmido e seco do pulmão não apresentou diferença entre os grupos. Os pesos das estruturas cardíacas confirmam os achados ecocardiográficos de hipertrofia nos grupos doentes, no entanto, o tratamento com a empagliflozina somente influenciou positivamente a relação peso úmido e seco do VE.

Tabela 8. Parâmetros corporais e cardíacos dos animais

	Sham (n=15)	Sham-Emp (n=16)	EAO (n=16)	EAO-Emp (n=24)
VE (g)	0,96 ± 0,11	0,92 ± 0,09	1,64 ± 0,20*	1,58 ± 0,14 [#]
VE/PC (g/kg)	1,97 ± 0,16	2,05 ± 0,12	3,80 ± 0,41*	3,79 ± 0,39 [#]
VD (g)	0,23 (0,21 - 0,26)	0,22 (0,20 - 0,25)	0,51 (0,44 - 0,57)*	0,45 (0,36 - 0,50) [#]
VD/PC (g/kg)	0,49 (0,44 - 0,55)	0,49 (0,45 - 0,55)	1,15 (1,08 - 1,34)*	1,10 (0,91 - 1,24) [#]
Átrios (g)	0,10 (0,09 - 0,12)	0,10 (0,09 - 0,12)	0,38 (0,28 - 0,44)*	0,32 (0,25 - 0,39) [#]
Átrios/PC (g/kg)	0,21 (0,19 - 0,24)	0,22 (0,21 - 0,24)	0,91 (0,65 - 0,99)*	0,77 (0,63 - 1,03) [#]
VE úmido/seco	3,81 ± 0,32	3,90 ± 0,38	4,38 ± 0,16*	4,17 ± 0,33 ^{#§}
VD úmido/seco	4,16 (4,06 - 4,25)	4,15 (4,08 - 4,25)	4,54 (4,49 - 4,60)*	4,47 (4,17 - 4,56) [#]
Átrios úmido/seco	4,28 ± 0,48	4,13 ± 0,40	4,73 ± 0,30*	4,66 ± 0,39 [#]
Pulmão úmido/seco	4,56 (4,45 - 4,77)	4,62 (4,50 - 4,66)	4,73 (4,58 - 4,94)	4,66 (4,45 - 4,78)
Fígado úmido/seco	3,05 (3,00 - 3,11)	3,08 (2,99 - 3,10)	3,18 (3,07 - 3,28)*	3,16 (3,11 - 3,25) [#]

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. *: p<0,05 vs. Sham; #: p<0,05 vs. Sham-Emp; §: p<0,05 vs. EAO (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Marcadores de estresse oxidativo, inflamação e hipertrofia

A Tabela 9 apresenta os dados de carbonilação de proteínas e malondialdeído (MDA) no plasma dos animais. O MDA é um marcador de estresse oxidativo produzido quando espécies reativas causam danos aos lipídeos. A carbonilação é um dano que ocorre em alguns aminoácidos de proteínas. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos nesses marcadores de estresse oxidativo.

As Tabelas 10, 11 e 12 apresentam os dados de expressão proteica no miocárdio. As proteínas calcineurina, cicloxigenase-2, BNP, NFAT, TNF-alfa e iNOS não apresentaram diferença entre os grupos. A expressão da interleucina-6 foi maior nos grupos com estenose aórtica em comparação com os respectivos controles. A interleucina-6 e a cicloxigenase-2 estão relacionadas com a inflamação.

A via das MAPK e NF-κB está envolvida na hipertrofia patológica decorrente de sobrecarga de pressão. Induz mudanças intracelulares, promove crescimento, apoptose, inflamação e transformação celular. As proteínas da via das MAPK (JNK, p38 e ERK) não apresentaram diferenças entre os grupos nas formas fosforiladas e totais. Em relação a via do NF-κB apenas a expressão da p65 total foi maior no grupo EAO em relação ao Sham. A expressão proteica do IκB, fosforilada e total, e a p65 fosforilada não foi diferente entre os grupos.

Tabela 9: Marcadores de estresse oxidativo no soro

Variáveis	Sham (n=8)	Sham-Emp (n=8)	EAO (n=8)	EAO-Emp (n=8)
Carbonilação de proteínas (nmol/mg proteína)	152 ± 30,3	160 ± 17,9	166 ± 20,2	168 ± 21,4
Malondialdeído (nmol/mg proteína)	1,53 ± 0,50	1,51 ± 0,27	1,55 ± 0,16	1,67 ± 0,30

Valores expressos em média e desvio padrão. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina. (ANOVA).

Tabela 10. Expressão proteica no miocárdio

	Sham (n=7)	Sham-Emp (n=7)	EAO (n=7)	EAO-Emp (n=7)
Calcineurina	0,88 (0,67 - 1,61)	0,92 (0,31 - 1,24)	0,80 (0,23 - 1,61)	0,38 (0,27 - 0,43)
Ciclooxigenase 2	1,00 ± 0,50	1,20 ± 0,72	1,14 ± 0,58	1,32 ± 0,86
BNP	1,00 ± 0,56	0,98 ± 0,44	0,95 ± 0,60	0,79 ± 0,29
TNF-alfa	1,00 ± 0,49	1,74 ± 1,09	1,75 ± 1,39	1,26 ± 0,79
NFAT	1,00 ± 0,47	1,02 ± 0,32	1,09 ± 0,48	0,84 ± 0,39
Interleucina-6	1,00 ± 0,74	1,57 ± 0,99	2,14 ± 1,33*	2,93 ± 0,89#

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 (unidade arbitrária). Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 11. Expressão proteica da via das MAPK no miocárdio

		Sham (n=7)	Sham-Emp (n=7)	EAO (n=7)	EAO-Emp (n=7)
JNK	Fosforilada	1,07 (0,70 - 1,41)	1,08 (0,73 - 1,42)	0,97 (0,64 - 1,46)	0,81 (0,42 - 1,10)
	Total	1,00 ± 0,37	1,02 ± 0,53	0,82 ± 0,34	0,69 ± 0,33
p38	Fosforilada	1,00 ± 0,69	0,96 ± 0,53	0,81 ± 0,54	0,62 ± 0,21
	Total	1,00 ± 0,30	0,85 ± 0,49	1,36 ± 1,52	1,05 ± 20,45
ERK	Fosforilada	1,00 ± 0,36	0,85 ± 0,29	0,83 ± 0,24	0,90 ± 0,23
	Total	1,02 (0,71 - 1,32)	1,32 (0,75 - 1,75)	1,15 (0,65 - 1,63)	0,74 (0,56 - 0,94)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 (unidade arbitrária). Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Tabela 12. Expressão proteica da via do NF-kB no miocárdio

		Sham (n=7)	Sham-Emp (n=7)	EAO (n=7)	EAO-Emp (n=7)
p65 NF-kB	Fosforilada	1,00 ± 0,79	0,87 ± 0,53	1,42 ± 0,16	1,21 ± 0,75
	Total	1,00 ± 0,75	1,72 ± 1,06	2,05 ± 1,22*	0,95 ± 0,80
IκB	Fosforilada	0,65 (0,30 - 1,99)	1,05 (0,41 - 3,45)	0,73 (0,33 - 1,25)	0,70 (0,52 - 0,88)
	Total	1,00 ± 0,60	1,07 ± 0,78	1,30 ± 0,65	0,56 ± 0,35

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 (unidade arbitrária). Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

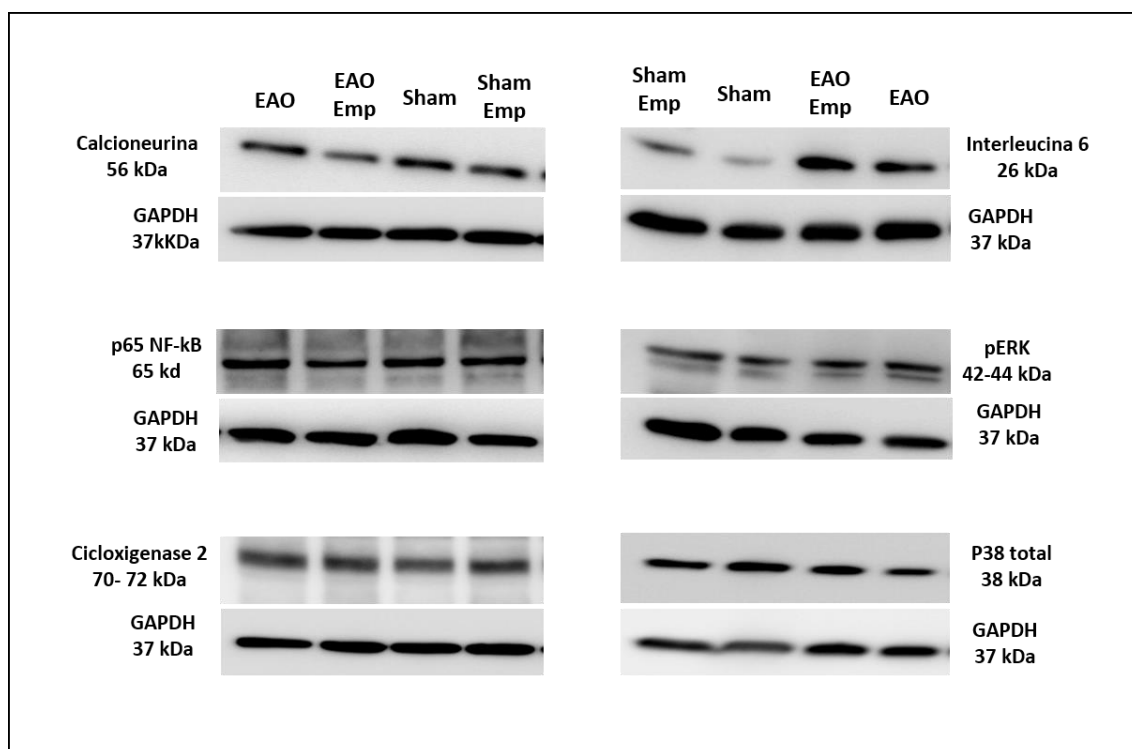


Figura 1. Imagem representativa do Western blot. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina.

Metabolismo energético

A Tabela 13 apresenta os dados da atividade das enzimas do metabolismo energético. Os dados mostram que os grupos com EAO apresentam diminuição da atividade das enzimas fosfofrutoquinase, creatina quinase, citrato sintase e β -hidroxiacil-CoA desidrogenase em comparação aos respectivos controles. As enzimas hexoquinase, piruvato quinase, lactato desidrogenase e carnitina palmitoil transferase 1 não apresentaram diferença entre os grupos.

Tabela 13. Atividade das enzimas do metabolismo energético

Enzimas (nmol/mg)	Sham (n=8)	Sham-Emp (n=8)	EAO (n=8)	EAO-Emp (n=8)
HK	43,5 ± 7,96	48,7 ± 9,33	43,2 ± 6,67	49,9 ± 4,47
PFK	61,7 ± 6,48	67,8 ± 6,60	51,5 ± 5,86*	51,4 ± 5,80 [#]
PK	1112 ± 62	1043 ± 96	1121 ± 100	1115 ± 101
LDH	186 ± 18	188 ± 25	183 ± 19	210 ± 23
CK	199 ± 10	198 ± 17	134 ± 20*	123 ± 9 [#]
CS	183 ± 11	175 ± 26	136 ± 15*	129 ± 16 [#]
BHADH	71,2 ± 9,89	66,6 ± 13,1	28,4 ± 8,51*	19,6 ± 8,69 [#]
CPT1	2,42 ± 0,43	2,45 ± 0,83	2,93 ± 0,75	2,86 ± 0,38

Valores expressos em média e desvio padrão. Sham-Emp: grupo controle tratado com empagliflozina; EAO: grupo com estenose aórtica; EAO-Emp: grupo com estenose aórtica tratado com empagliflozina; HK: hexoquinase; PFK: fosfofrutoquinase; PK: piruvato quinase; LDH: lactato desidrogenase; CK: creatina quinase; CS: citrato sintase; BHADH: β-hidroxiacil-CoA desidrogenase; CPT1: carnitina palmitoil transferase 1. *: p<0,05 vs. Sham; #: p<0,05 vs. Sham-Emp (ANOVA).

Análise do transcriptoma no miocárdio

Um total de 1.078 genes expressos diferencialmente foram identificados, compreendendo 662 genes regulados positivamente (69 genes em EAO vs. Sham; 593 em EAO-Emp vs. EAO) e 416 genes regulados negativamente (28 genes em EAO vs. Sham; 388 em EAO-Emp vs. EAO). Os principais genes regulados positivamente foram Loxl1, Mfap4, Postn, Col8a1, Pi16 e Nppa em EAO vs. Sham; e Mxra8, Zfta, Pnlsr, Thoc1 e Ralbp1 na comparação EAO-Emp vs. EAO. Os principais genes regulados negativamente foram Mxra8, Ralbp1 e Tubgcp6 em EAO vs. Sham; e Itgb5, Ltbp2, Tmem109, Plec e Rorc na comparação EAO-Emp vs. EAO (Figura 2). Esses genes estão envolvidos na apoptose, organização mitocondrial, matriz extracelular colágena e potencialmente relacionados a insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica.

Nas Figuras 3 e 4 são exibidos os principais termos enriquecidos da biblioteca do conjunto de genes GO_Biological_Process_2023 (Enrinchr). Os 10 principais termos enriquecidos para o conjunto de genes de entrada são exibidos com base em -log10 (valor p), com o valor p real mostrado ao lado de cada termo. O termo no topo tem a sobreposição mais significativa com o conjunto de genes de consulta de entrada. Todos os processos biológicos apresentados nas figuras apresentam diferenças estatísticas (Figura 3: EAO vs. sham; Figura 4: EAO-Emp vs. EAO).

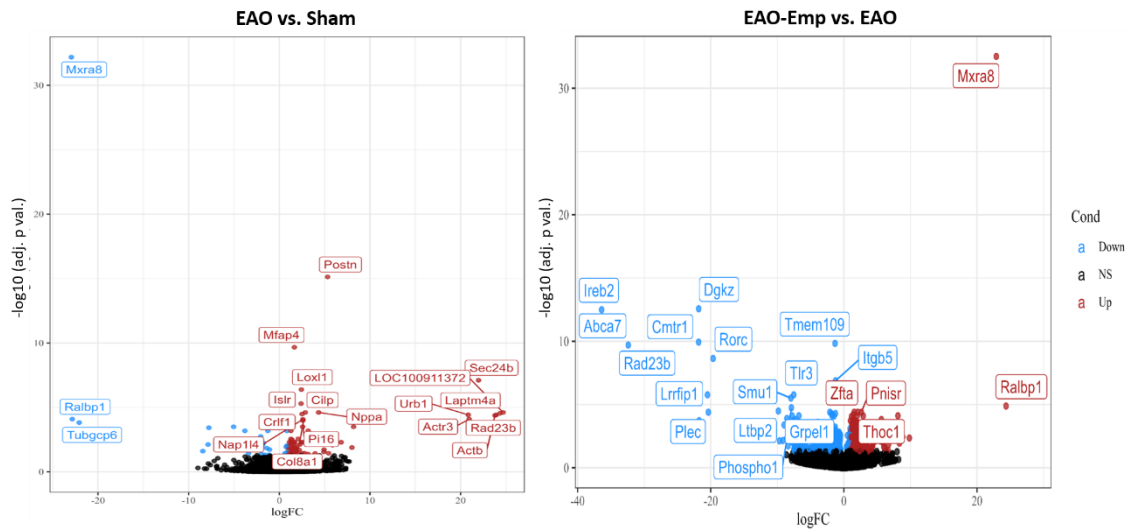


Figura 2: Volcano plot das transcrições cardíacas. Genes significativamente regulados negativamente são observados em azul e regulados positivamente em vermelho; genes alterados não significativamente estão em preto.

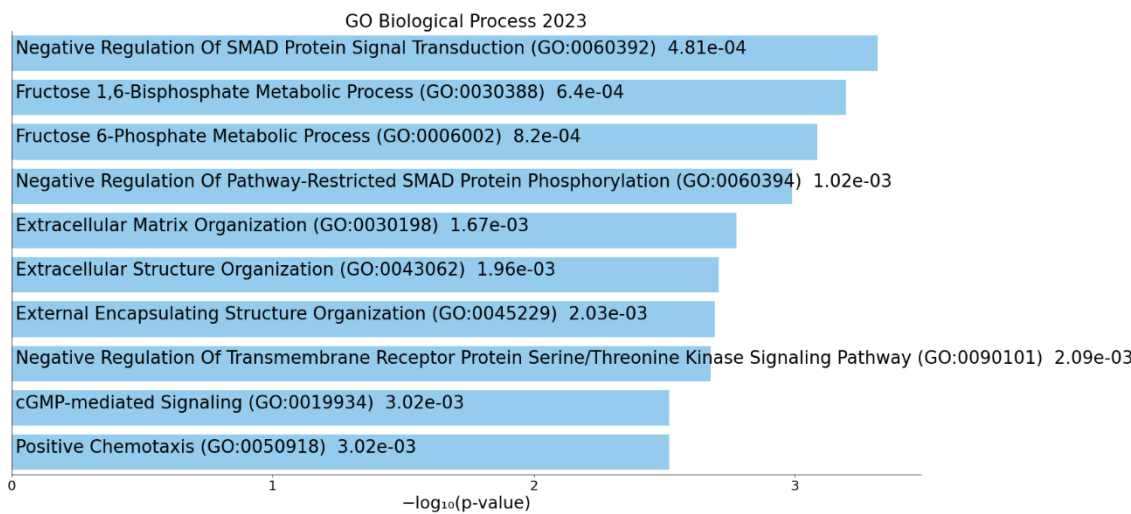


Figura 3: Gráfico de barras dos principais termos enriquecidos da biblioteca do conjunto de genes GO_Biological_Process_2023. (EAO vs. Sham; $-\log_{10}(\text{valor } p)$)

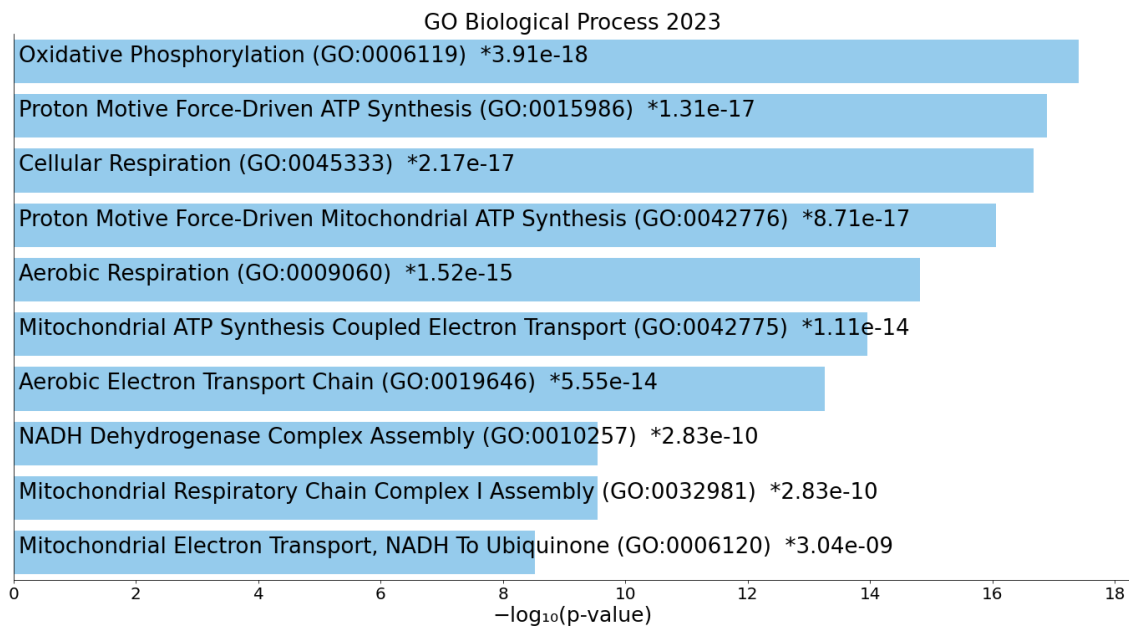


Figura 4: Gráfico de barras dos principais termos enriquecidos da biblioteca do conjunto de genes GO_Biological_Process_2023 (EAO-Emp vs. EAO; -log₁₀ (valor p))

Cultura de células H9C2

Padronização das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e empagliflozina

Inicialmente, as células foram mantidas em cultura para monitorar o tempo de crescimento e confluência. Posteriormente, iniciou-se a padronização da concentração de H₂O₂ e empagliflozina. As concentrações iniciais propostas no projeto, com base na literatura, revelaram-se tóxicas para as células, resultando em uma mortalidade praticamente total (Figuras 5 e 6).

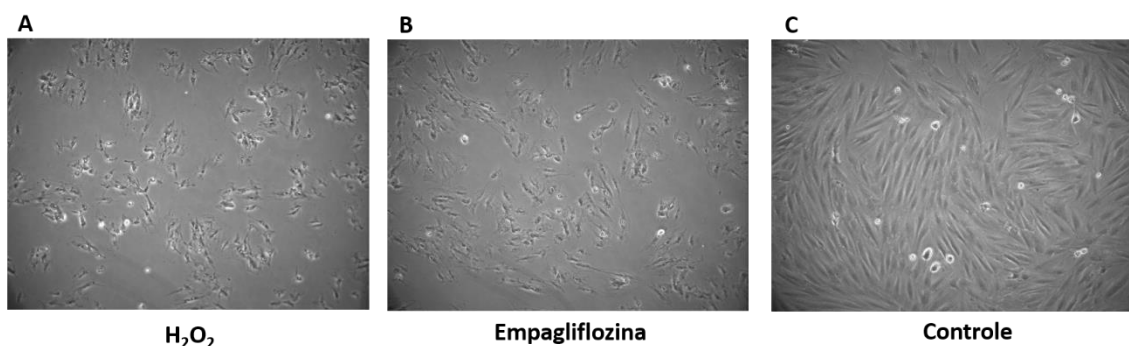


Figura 5: Cultura de células H9C2. A: células H9C2 tratadas com 0,3 mM H₂O₂ por 6 horas; B: células H9C2 tratadas com 500 nM de empagliflozina por 16 horas; C: Células controle.

Após a realização de ensaios com diferentes concentrações de H_2O_2 e empagliflozina, observou-se que na condição de concentração de $23\ \mu\text{M}$ H_2O_2 e $300\ \text{nM}$ empagliflozina, a taxa de mortalidade celular foi inferior a 30%. Isso proporcionou uma quantidade adequada de proteínas para a execução da técnica de Western blot. Os resultados da concentração de proteínas estão detalhados na Tabela 14. Não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados após os ensaios. Após a quantificação de proteínas foi iniciado a técnica de Western blot.

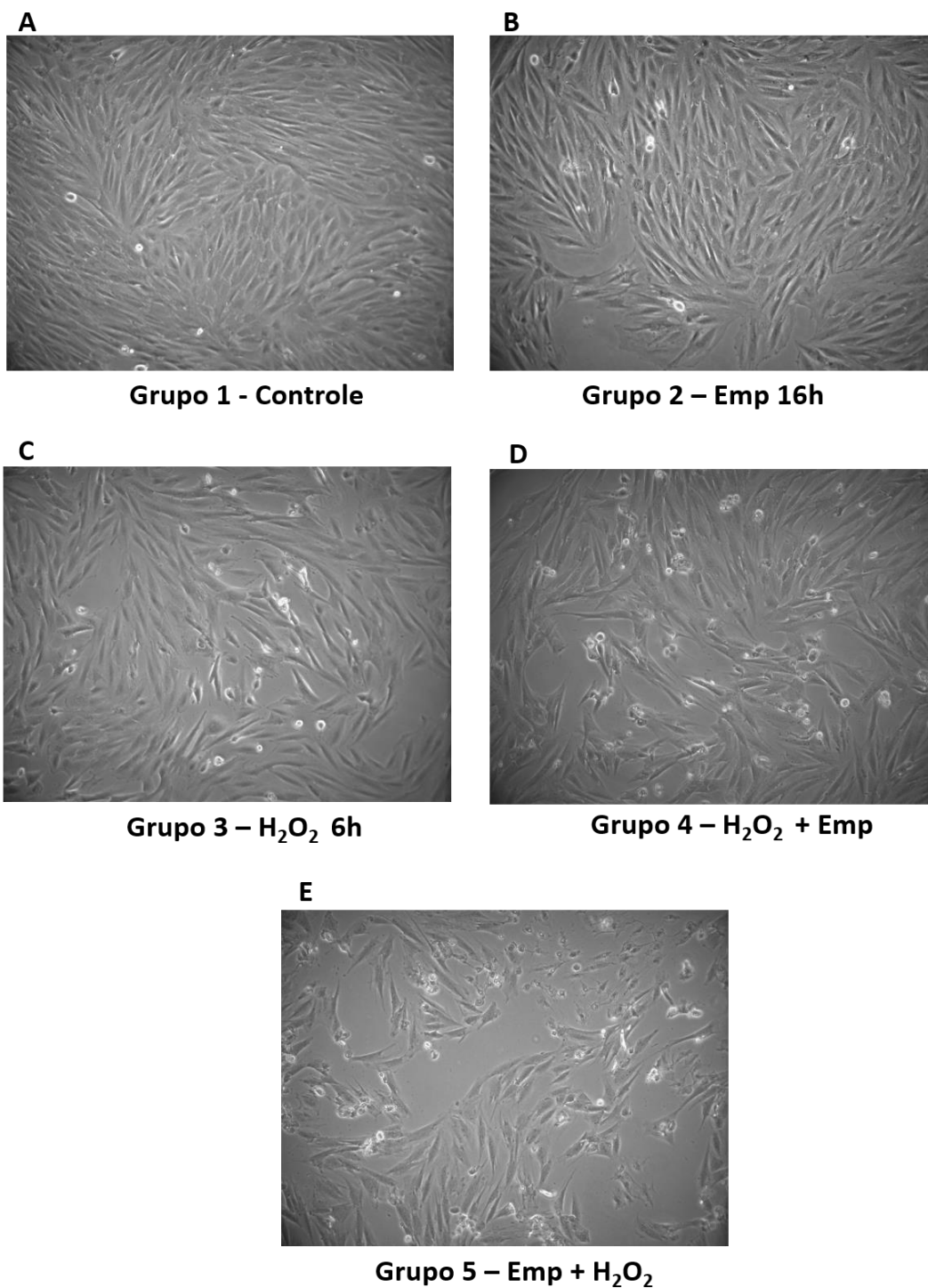


Figura 6: Tratamento das células H9C2. A: grupo 1 – controle, células H9C2 em meio de cultura; B: grupo 2 - grupo tratado com empagliflozina por 16 horas; C: grupo 3 – grupo tratado com H₂O₂ por 6 horas; D: grupo 4 - tratado com H₂O₂ por 6 horas + empagliflozina por 16 horas; E: grupo 5 - tratado com empagliflozina por 2 horas + H₂O₂ por 24 horas.

Tabela 14: Concentração de proteínas das células H9C2

Grupos	Concentração de proteínas (µg/µL)
Controle	2,14 ± 0,35
Emp	2,16 ± 0,44
H ₂ O ₂	1,95 ± 0,35
H ₂ O ₂ +Emp	1,96 ± 0,39
Emp+H ₂ O ₂	1,82 ± 0,40

Valores expressos em média e desvio padrão. Controle: células H9C2 em meio de cultura; Emp: grupo tratado com empagliflozina por 16 horas; H₂O₂: grupo tratado com H₂O₂ por 6 horas; H₂O₂+Emp: grupo tratado com H₂O₂ por 6 horas + empagliflozina por 16 horas; Emp+H₂O₂ grupo tratado com empagliflozina por 2 horas + H₂O₂ por 24 horas.

Na Tabela 15 estão as proteínas avaliadas por Western blot. Não houve diferenças entre os tratamentos em nenhuma proteína avaliada. As proteínas fosforiladas da via MAPKs e NF-kB não apresentaram blots que pudessem ser quantificados. Os anticorpos utilizados não foram eficientes para marcar a expressão dessas proteínas fosforiladas nas culturas de células H9C2.

Tabela 15: Expressão proteica das células H9C2 após tratamentos

	Controle	Emp	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ +Emp	Emp+H ₂ O ₂
ERK	1,00 ± 0,57	2,71 ± 1,97	2,78 ± 1,29	2,90 ± 1,06	3,91 ± 2,02
p38	1,00 ± 0,15	0,81 ± 0,20	0,72 ± 0,22	0,66 ± 0,15	0,64 ± 0,39
p65 NF-kB	1,00 ± 0,58	1,15 ± 0,70	0,63 ± 0,45	0,73 ± 0,61	0,96 ± 0,78
IκB	1,00 ± 0,05	0,95 ± 0,55	1,07 ± 0,19	1,06 ± 0,46	1,32 ± 0,13
Interleucina-6	1,00 ± 0,67	0,96 ± 0,97	0,78 ± 0,44	0,80 ± 0,72	0,57 ± 0,77
NRF-2	1,00 ± 0,68	1,33 ± 0,72	1,68 ± 0,31	0,97 ± 0,28	1,46 ± 1,14
TNF-alfa	1,00 ± 0,07	1,17 ± 0,27	1,26 ± 0,80	0,76 ± 0,39	0,89 ± 0,68
Superóxido dismutase	1,00 ± 0,93	1,73 ± 0,80	1,70 ± 1,54	1,03 ± 0,45	0,39 ± 0,29

Valores expressos em média e desvio padrão. Controle: células H9C2 em meio de cultura; Emp: grupo tratado com empagliflozina por 16 horas; H₂O₂: grupo tratado com H₂O₂ por 6 horas; H₂O₂+Emp: grupo tratado com H₂O₂ por 6 horas + empagliflozina por 16 horas; Emp+H₂O₂ grupo tratado com empagliflozina por 2 horas + H₂O₂ por 24 horas. Cada grupo contém 3 experimentos.

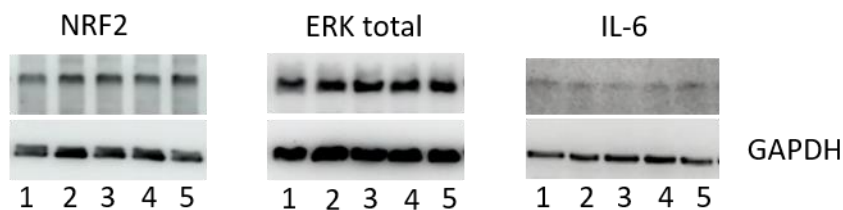


Figura 7. Imagem representativa do Western blot. 1: controle, células H9C2 em meio de cultura; 2: grupo tratado com empagliflozina por 16 horas; 3: grupo tratado com H₂O₂ por 6 horas; 4: tratado com H₂O₂ por 6 horas + empagliflozina por 16 horas; 5: grupo tratado com empagliflozina por 2 horas + H₂O₂ por 24 horas.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado a influência do tratamento com empagliflozina, durante 8 semanas, no remodelamento cardíaco de animais com insuficiência cardíaca (IC) induzida por estenose aórtica. O tratamento com empagliflozina foi iniciado após 18 semanas da cirurgia pois, nesse modelo experimental, após esse período os animais começam a apresentar sinais de IC (Gomes *et al.*, 2015). Após a fase de tratamento, o grupo EAO apresentou mortalidade três vezes maior que o grupo EAO-Emp. Além disso, o grupo tratado apresentou menor frequência de sinais de IC, especificamente a ascite e congestão hepática, em comparação com o grupo EAO. Esses dados demonstram atenuação da IC no grupo tratado.

A avaliação do exame de ecocardiografia foi utilizada com a finalidade de analisar as estruturas e funções cardíacas e determinar o comprometimento causado pela IC. Anteriormente a realização do tratamento com empagliflozina foi realizado ecocardiograma para garantir a distribuição uniforme dos animais entre os grupos estudados, e comprovar comprometimento cardíaco dos animais que foram submetidos a cirurgia de estenose aórtica. Ao final do período experimental, novo exame foi realizado. Os parâmetros estruturais do coração demonstram que os grupos com estenose aórtica apresentam hipertrofia característica da sobrecarga induzida pela estenose. No entanto, o grupo EAO-Emp apresentou melhora dos parâmetros estruturais em relação ao grupo EAO, o que mostra efeitos benéficos do tratamento. A avaliação da função sistólica e diastólica mostra comprometimento nos grupos com estenose aórtica em relação aos grupos saudáveis. O grupo EAO-Emp apresentou melhora da função diastólica e atenuação da disfunção sistólica. Esses dados mostram efeito protetor da empagliflozina na função ventricular avaliada por ecocardiograma. Por outro lado, estudo realizado por Byrne *et al.* (2017) observou melhora da função sistólica, mas sem alterações no remodelamento cardíaco e da função diastólica em animais com IC por sobrecarga pressórica tratados com empagliflozina por 2 semanas. O tratamento por 8 semanas demonstrou ser eficiente em melhorar as estruturas cardíacas nos animais com IC.

As variáveis anatômicas obtidas *post mortem* confirmam os dados ecocardiográficos de hipertrofia do coração dos animais com estenose aórtica. Os animais do grupo EAO-Emp apresentaram melhora apenas na relação peso úmido e seco do VE.

O estresse oxidativo também tem sido relacionado com a fisiopatologia da IC. O desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a produção de espécies reativas de

oxigênio (ERO) contribui para piora do remodelamento cardíaco. Sob condições patológicas, as ERO endógenas se acumulam nas mitocôndrias cardíacas e dificulta a função mitocondrial. A exposição crônica e prolongada às ERO leva a deterioração adicional do miocárdio devido a apoptose, necrose e fibrose (Hao *et al.*, 2015), indicando que o estresse oxidativo é uma característica da IC. A avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em nosso estudo não apresentaram diferenças entre os grupos. Era esperado que os grupos com estenose aórtica tivessem aumento desses marcadores, no entanto, o MDA e a carbonilação de proteínas no soro não diferiram entre os grupos.

O aumento da inflamação está relacionado com o desenvolvimento da IC, e vem sendo alvo de intervenções para possível tratamento da IC (Byrne *et al.*, 2020). As citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina-6 têm sido amplamente implicadas na patogênese da IC (Hanna *et al.*, 2020). Nos cardiomiócitos, a interleucina-6 exerce efeito inotrópico negativo e promove resposta hipertrófica, mas também pode exercer ações protetoras, mediadas pela preservação da função mitocondrial (Kinugawa *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 2006; Melendez *et al.*, 2010; Zang *et al.*, 2024). Nossos dados mostram aumento da interleucina-6 no ventrículo esquerdo dos animais doentes, e o tratamento com empagliflozina não foi capaz de alterar essa citocina.

O papel da cicloxigenase-2 (COX-2) como fator de proteção cardíaco parece ser controverso. Em estudo com ratos deficientes de COX-2, os autores observaram o desenvolvimento espontâneo da IC, e isso foi relacionado a desregulação do metabolismo energético (Wan *et al.*, 2020). Da mesma forma, Guo *et al.* (2019) demonstraram que a superexpressão cardíaca específica de COX-2 exerce efeito cardioprotetor potente na lesão de isquemia-reperfusão do miocárdio em camundongos, e que a superexpressão crônica de COX-2 não está associada a nenhum efeito deletério. Por outro lado, em cardiomiócitos localizados na área do infarto do miocárdio, a expressão da COX-2 foi associada ao aumento de apoptose (Abbate *et al.*, 2004). Em nosso estudo não encontramos diferença na expressão da COX-2.

A ativação excessiva no coração de calcineurina, proteína que faz parte da sinalização do cálcio, contribui para o remodelamento hipertrófico patológico e progressão para IC (Parra *et al.*, 2017). Em nossos dados, a expressão de calcineurina não está alterada, e com isso demonstra não estar envolvida no remodelamento miocárdico observado nos animais doentes, e o tratamento com empagliflozina também não alterou sua expressão.

O processo de remodelamento cardíaco decorrente da sobrecarga de pressão, a longo prazo, traz prejuízos funcionais ao coração. Esse processo é complexo e envolve diferentes mecanismos e vias de sinalização. A via do NF- κ B está envolvida na regulação de genes da cascata inflamatória e possui uma proteína de transcrição com regiões de ligação ao DNA (Mayo *et al.*, 1997). O NF- κ B é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 e p50. Quando não estimulado, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. A fosforilação do I κ B libera o NF- κ B de forma que ele possa atuar sobre um gene alvo no núcleo enquanto o I κ B é degradado (Bloom *et al.*, 2019). Em nosso estudo, observamos maior expressão da p65 no grupo com EAO em relação ao grupo controle. A p65 é a subunidade que possui ação no gene alvo no núcleo celular e com isso pode controlar a produção de genes inflamatórios como a interleucina-6.

O estresse mecânico no miocárdio, causado pela sobrecarga de pressão, pode induzir o aumento das ERO nos cardiomiócitos, ativando vias de sinalização, como a da família das MAPK, envolvidas no processo de remodelamento cardíaco. Dentre as MAPK, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-jun NH₂-terminal (JUNK) e a quinase p38 são mediadores da sinalização hipertrófica das células miocárdicas e induzem a transcrição de genes associados à hipertrofia (Garcia *et al.*, 2008). Era esperado que a expressão dessas proteínas estivesse aumentada nos grupos com EAO em relação aos grupos controles, entretanto, não foi observada diferença provavelmente devido a técnica utilizada nesse estudo.

Os dados do metabolismo mostram que a atividade das enzimas fosfofrutoquinase, creatina quinase, citrato sintase e β -hidroxiacil-CoA desidrogenase está diminuída nos grupos doentes. A diminuição da atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase demonstra piora da oxidação dos lipídeos que pode afetar a produção de acetil CoA para o ciclo do ácido cítrico. A citrato sintase catalisa a primeira reação do ciclo do ácido cítrico formando citrato em acetil CoA e oxalacetato. Com a diminuição da citrato sintase essa reação é afetada prejudicando a produção de ATP por essa via. A via da glicólise também parece estar prejudicada nos animais doentes, devido a redução da enzima fosfofrutoquinase. O tratamento com empagliflozina demonstrou não alterar a atividade das enzimas avaliadas em nosso estudo.

A análise do transcriptoma mostra regulação positiva dos genes *Loxl1*, *Mfap4*, *Postn* e *Col8a1*. Esses genes estão envolvidos nas ligações cruzadas de colágeno, formação de fibras elásticas e fibrilinas, cicatrização, regeneração de tecido, e

relacionados com a composição da matriz extracelular como demonstrado pelos processos biológicos na comparação do grupo EAO vs. Sham (Conway *et al.*, 2008; Rodrigues & Martínez-González, 2019; Pelicki *et al.*, 2021; Alzhrani *et al.*, 2024). Dentre os processos biológicos essenciais que foram influenciados pelos genes expressos diferencialmente, destacam-se a regulação da proteína SMAD, associada à via do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e à fibrose, o metabolismo da glicólise e a organização da matriz extracelular (Alva *et al.*, 2016; Saadat *et al.*, 2020). Alteração na via da glicólise também foi observada na análise do metabolismo energético com a alteração da enzima fosfofrutoquinase. A modificação na regulação desses genes, no grupo EAO, pode ser devido à sobrecarga de pressão causada pela estenose aórtica. A intensificação dos processos biológicos ligados à matriz extracelular pode contribuir para fibrose excessiva no miocárdio, acarretando uma série de consequências adversas (Berk *et al.*, 2007).

Os principais genes regulados negativamente, *Ltbp2*, *Tmem109*, *Plec* e *Rorc*, na comparação entre o grupo EAO-Emp e o EAO, estão relacionados com a via do TGF- β , autofagia, clivagem apoptótica e produção de citocinas (Beil *et al.*, 2002; Hueber *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2023). Estudos em corações humanos e de animais com IC demonstraram que o mRNA do *Ltbp2* estava aumentado, sugerindo ser um potencial biomarcador de IC (Bilchick *et al.*, 2006; Gabrielsen *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008). A regulação negativa desses genes pode ser decorrente do efeito protetor da empagliflozina. Quanto aos genes regulados positivamente, *Thoc1*, *Pnlsr* e *Zfta*, são genes relacionados a *splicing* e ligação de RNA e regulação de DNA (Wang *et al.*, 2009; Jin, 2022). O gene *Ralbp1*, diferencialmente expresso, desempenha várias funções celulares importantes, incluindo resposta ao estresse oxidativo e regulação da apoptose, sendo fundamental na homeostase celular (Awasthi *et al.*, 2021). Outro gene diferencialmente expresso, *Mxra8*, codifica a proteína denominada *matrix-remodeling-associated 8*, que tem papel na remodelação da matriz extracelular e na interação entre células e a matriz circundante (Simpson *et al.*, 2023). Os principais processos biológicos que sofreram interferência dos genes diferencialmente expressos estão relacionados a atividade mitocondrial, produção de energia e respiração celular. A empagliflozina demonstra regular gene importante para a homeostase dos cardiomiócitos, no entanto, ativa genes relacionados a remodelação da matriz extracelular que podem piorar a fibrose cardíaca.

No presente estudo, foram cultivadas células H9C2 e expostas à H₂O₂

extracelular, pois a lesão oxidativa causada pela H_2O_2 é um modelo útil para fornecer informações sobre os efeitos do estresse oxidativo na função celular *in vitro* (Diestel *et al.*, 2011). Após tratamento com H_2O_2 , ocorre formação de radicais livres que, por sua vez, danificam as biomembranas e os filamentos dos cardiomiócitos, resultando em apoptose (Li *et al.*, 2018). Em nosso estudo com células H9C2, após exposição ao H_2O_2 e tratamento com empagliflozina, não observamos diferenças nos marcadores de hipertrofia patológica, inflamação e estresse oxidativo. Diferentemente, Abdulrahman *et al.* (2022) observaram que a empagliflozina reduziu a hipertrofia de cardiomioblastos de H9C2 induzida por angiotensina, demonstrando inibição da expressão do trocador Na^+/H^+ (NHE). No entanto, a avaliação da via relacionada a hipertrofia desse estudo foi diferente da investigada em nosso estudo. Da mesma forma, em células endoteliais humanas, a empagliflozina reduziu a atividade do trocador NHE e a concentração citoplasmática de sódio, o que resultou na diminuição do estresse oxidativo causado pela inflamação (Uthman *et al.*, 2022). O estudo sugere que a ação da empagliflozina nessa via pode oferecer proteção a doenças como a insuficiência cardíaca.

Em resumo, nossos dados demonstram que a empagliflozina, no modelo animal de estenose aórtica, reduziu a ascite, congestão hepática, DDVE, DSVE, AE, DDVE/PC, MVE, IMVE, e aumentou o TRIV, A' média e A' septal. Foi observada modulação de genes que atuam na remodelação da matriz extracelular, apoptose, via do TGF- β , autofagia e produção de citocinas. *In vitro*, o tratamento com a empagliflozina em células H9C2 exposta ao H_2O_2 não influenciou a concentração de proteínas e não interferiu nas vias avaliadas.

CONCLUSÃO

A empagliflozina melhora o remodelamento cardíaco, a função diastólica e reduz a frequência dos sinais de insuficiência cardíaca e modula genes e processos biológicos miocárdicos envolvidos na apoptose, fibrose e produção de citocina em ratos com estenose aórtica.

REFERÊNCIAS

Abbate A *et al.* Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression at the site of recent myocardial infarction: friend or foe? Heart. 2004;90:440-3.

Abdulrahman N *et al.* Empagliflozin inhibits angiotensin II-induced hypertrophy in H9c2 cardiomyoblasts through inhibition of NHE1 expression. *Mol Cell Biochem.* 2022;477:1865-72.

Alva N *et al.* Fructose 1,6-bisphosphate: A summary of its cytoprotective mechanism. *Curr Med Chem.* 2016;23:4396-417.

Alzhrani AA *et al.* KDM3A knockdown regulates COMP, LOX, COL8A1 and ACOT1 genes in myocardial fibrosis. *Bioinformation.* 2024;20:305-13.

Awasthi S *et al.* RALBP1 in oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Cells.* 2021;10:3113.

Baeuerle PA & Baltimore D. I kappa B: A specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science.* 1988;242:540-6.

Bai Y *et al.* LTBP-2 acts as a novel marker in human heart failure - a preliminary study. *Biomarkers.* 2012;17:407-15.

Beil M *et al.* Caspase 8-mediated cleavage of plectin precedes F-actin breakdown in acinar cells during pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:G450-60.

Berk BC *et al.* ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest.* 2007;117:568-75.

Bilchick KC *et al.* Differential regional gene expression from cardiac dyssynchrony induced by chronic right ventricular free wall pacing in the mouse. *Physiol Genomics.* 2006;26:109-15.

Bloom MJ *et al.* The effects of IKK-beta inhibition on early NF-kappa-B activation and transcription of downstream genes. *Cell Signal.* 2019;55:17-25.

Byrne NJ *et al.* Empagliflozin prevents worsening of cardiac function in an experimental model of pressure overload-induced heart failure. *JACC Basic Transl Sci.* 2017;2:347-54.

Byrne NJ *et al.* Empagliflozin blunts worsening cardiac dysfunction associated with reduced NLRP3 (nucleotide-binding domain-like receptor protein 3) inflammasome activation in heart failure. *Circ Heart Fail.* 2020;13:e006277.

Chen X *et al.* TMEM11 regulates cardiomyocyte proliferation and cardiac repair via METTL1-mediated m⁷G methylation of ATF5 mRNA. *Cell Death Differ.* 2023;30:1786-98.

Conway SJ & Molkentin JD. Periostin as a heterofunctional regulator of cardiac development and disease. *Curr Genomics.* 2008;9:548-55.

Diestel A *et al.* Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H₂O₂ induced

apoptosis. *Cryobiology*. 2011;62:53-61.

Gabrielsen A *et al*. Gene expression signals involved in ischemic injury, extracellular matrix composition and fibrosis defined by global mRNA profiling of the human left ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:870-83.

Garcia JA & Incerpi EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90:409-16.

Gomes MJ *et al*. Beneficial effects of physical exercise on functional capacity and skeletal muscle oxidative stress in rats with aortic stenosis-induced heart failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8695716.

Guo Y *et al*. Inducible cardiac-specific overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) confers resistance to ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2019;114:32.

Kinugawa K *et al*. Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on $[Ca^{2+}]_i$ and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res*. 1994;75:285–95.

Hanna A & Frangogiannis NG. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2020;34:849-63.

Hao E *et al*. Cannabidiol protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy by modulating mitochondrial function and biogenesis. *Mol Med*. 2015;21:38-45.

Hueber AJ *et al*. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol*. 2010;184:3336-40.

Jin X. Regulatory network of serine/arginine-rich (SR) proteins: The molecular mechanism and physiological function in plants. *Int J Mol Sci*. 2022;23:10147.

Li Y *et al*. Corin protects H₂O₂-induced apoptosis through PI3K/AKT and NF- κ B pathway in cardiomyocytes. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:594-9.

Mayo MW *et al*. Requirement of NF κ B activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science*. 1997;278:1812-5.

Melendez GC *et al*. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension*. 2010;56:225-31.

Pilecki B *et al*. MFAP4 deficiency attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation through regulation of macrophage infiltration and activity. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:764337.

Parra V & Rothermel BA. Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;103:121-6.

Rodríguez C & Martínez-González J. The role of lysyl oxidase enzymes in cardiac function and remodeling. *Cells*. 2019;8:1483.

Saadat S *et al.* Pivotal role of TGF- β /Smad signaling in cardiac fibrosis: non-coding RNAs as effectual players. *Front Cardiovasc Med.* 2021;7:588347.

Simpson KE *et al.* Loss of MXRA8 delays mammary tumor development and impairs metastasis. *Int J Mol Sci.* 2023;24:13730.

Smart N *et al.* IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2006;69:164-77.

Wan Q *et al.* Congestive heart failure in COX2 deficient rats. *Sci China Life Sci.* 2021;64:1068-76.

Wang X *et al.* Thoc1 deficiency compromises gene expression necessary for normal testis development in the mouse. *Mol Cell Biol.* 2009;29:2794-803.

Wei YJ *et al.* Apolipoprotein D as a novel marker in human end-stage heart failure: a preliminar study. *Biomarkers.* 2008;13:535-48.

Uthman L *et al.* Empagliflozin reduces oxidative stress through inhibition of the novel inflammation/NHE/[Na⁺]_c/ROS-pathway in human endothelial cells. *Biomed Pharmacother.* 2022;146:112515.

Zhang H & Dhalla NS. The role of pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2024;25:1082.

ANÁLISES COMPLEMENTARES

Metabolômica do soro

Material e métodos

Extração de metabólitos: para a extração dos metabólitos, foram adicionados 100 μ L de amostra (soro) com 1000 μ L de grau espectroscópico de metanol em 2 mL de Eppendorf e esta mistura será incubada por 4 h em ultra-congelador (-80° C). Em seguida, será centrifugado por 15 min a 13.000 g e o sobrenadante transferido para Eppendorf de 2 mL, que será concentrado em concentrador a vácuo por 30 min e liofilizado. O material será armazenado em ultracongelador (-80° C) até o momento da análise. Para as análises de espectrometria de massa, as amostras foram ressuspensas em 500 μ L de metanol de grau espectroscópico e filtradas em filtro de 0,22 μ m.

Análise IES/MS por infusão direta: as análises IES/EM por infusão direta foram

realizadas em cromatógrafo líquido (Agilent modelo Infinity 1260) para injeção de amostra juntamente com espectrômetro de massa de alta resolução (Agilent® modelo 6520 B Q-TOF) com fonte de ionização por eletropulverização (IES). Os parâmetros cromatográficos são: fluxo constante de fase móvel de 0,2 mL.min⁻¹ com composição 90% metanol e 10% água acidificada com ácido fórmico (0,1%); o volume de injeção da amostra será de 10 µL. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás de secagem a 8 L.min⁻¹, temperatura de 220° C e energia de 4,5 KVa aplicada ao capilar.

Análise quimiométrica: as amostras de massa adquiridas por infusão direta foram extraídas para o formato TXT e submetidas ao programa MATLAB (MATrix LABoratory), no qual foram analisados os componentes principais (PCA) e PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados com calibração multivariada).

HPLC/MS: as análises de cromatografia líquida de alta eficiência acopladas a espectrômetro de massa (HPLC/MS) foram realizadas em cromatógrafo líquido (Agilent modelo Infinity 1260) acoplado a espectrômetro de massa de alta resolução tipo Q-TOF (Agilent® 6520 B) com fonte de ionização por eletropulverização (IES). Parâmetros cromatográficos: coluna Agilent modelo Zorbax C18, 2,1 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento e partículas de 2,7 µm; fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%, A) e metanol (B), com o seguinte gradiente: 2% B (0 min), 98% B (0 - 20 min); 100% B (20-23 min). Parâmetros de ionização: pressão do nebulizador de 20 psi, gás de secagem a 8 L.min⁻¹, temperatura de 220° C e energia capilar de 4,5 KVa. A identificação dos constituintes será realizada levando-se em consideração a massa de alta resolução (considerando o erro com a massa exata menor que 10 ppm) e os espectros de massa/massa (EM/EM) encontrados na literatura. Essas análises nos permitirão identificar metabólitos supra-regulados, sub-regulados e exclusivos em amostras de soro.

Resultados

Os dados dos metabólitos encontrados na análise da metabolômica do soro entre os grupos EAO e EAO-Emp e EAO vs. Sham estão apresentados nas Figura 2, 3 e 4. Após a análise de frequência e estatística foram identificados 11 metabólitos diferencialmente expressos, sendo 5 metabólitos EAO vs. EAO-Emp e 6 metabólitos EAO vs. Sham. Os metabólicos 2-hexacosanamido ethanesulfonic acid, 2-amino-2-methyl-1-propanol, Nα-acetyl-L-glutamine e phenylalanyl-glycine foram negativamente expressos no grupo EAO vs. EAO-Emp e o metabólito 3,9-dimethyldodecan-6-ol foi

positivamente expresso no grupo EAO vs. EAO-Emp. Os metabólitos OTK, 1-linoleoyl glycerol e 1-(Oalpha-D-mannopyramosyl)-29-keto-(1,3R, 31R)-dotriacontanetriol foram negativamente expressos no grupo EAO vs. Sham. Os metabólitos positivamente expressos foram 19-hydroxy-nonadecanoic acid, 3,9-dimethyldodecan-6-ol e 8E-tetradecenyl acetate no grupo EAO vs. Sham. A maioria desses metabólitos diferencialmente expressos participa de processos biológicos de lipídeos, metabolismo de ácidos graxos e estrutura de membranas celulares.

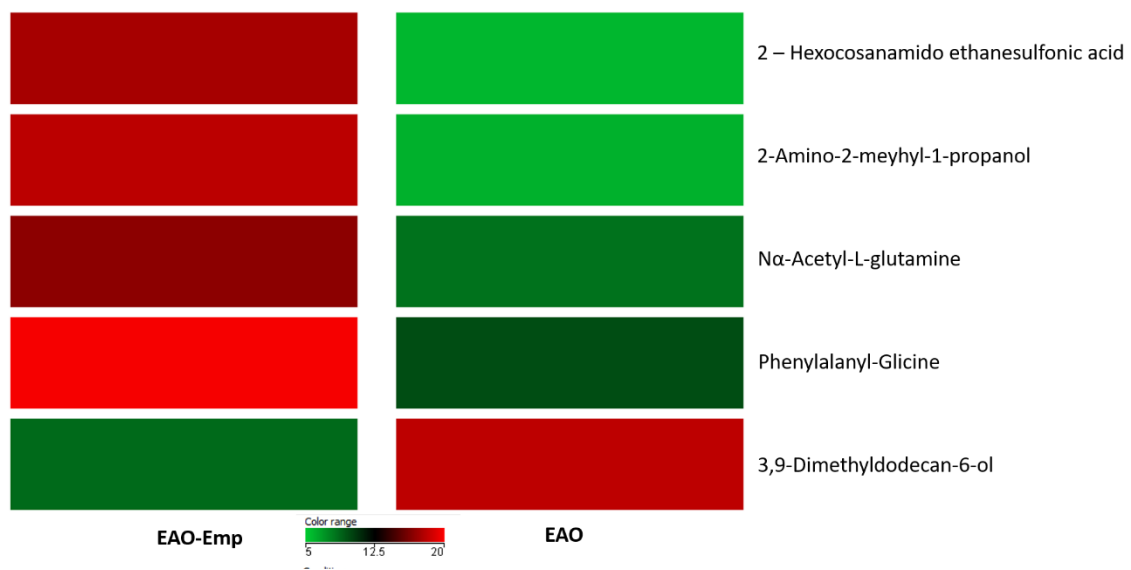


Figura 1: Heatmap das alterações quantitativas dos metabólitos expressos diferencialmente entre os animais com estenose aórtica (EAO) e os animais com estenose aórtica tratado com empagliflozina (EAO-Emp). Teste T não pareado ($p < 0,05$) e fold change maior ou igual a 2 ($n=5$).

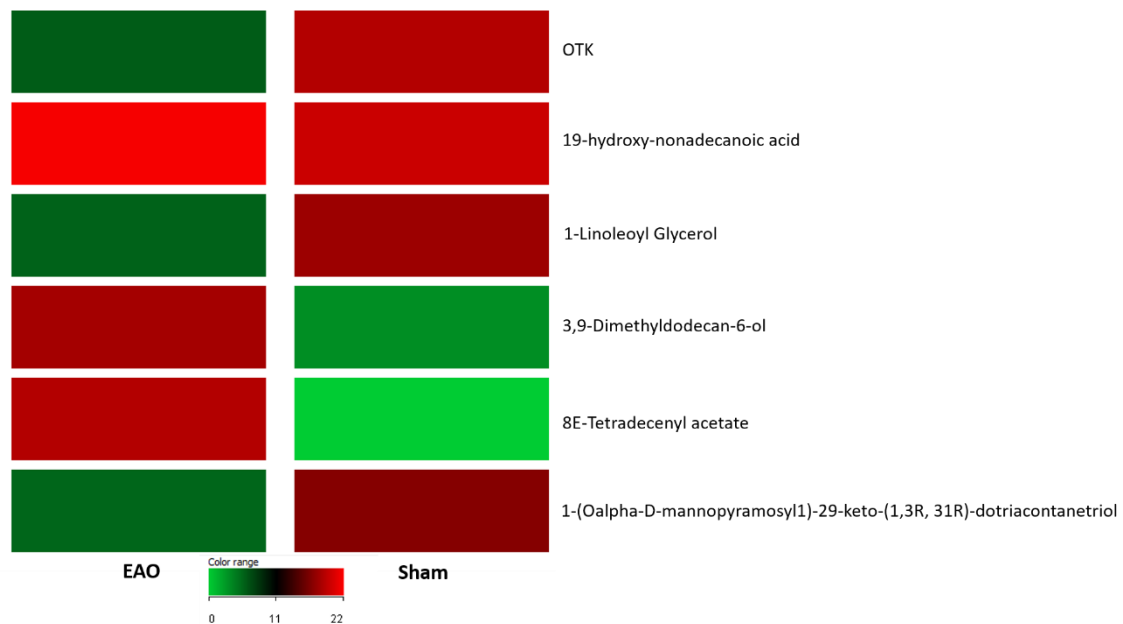


Figura 2: Heatmap das alterações quantitativas dos metabólitos expressos diferencialmente entre os animais com estenose aórtica (EAO) e os animais controles (Sham). Teste T não pareado ($p < 0,05$) e fold change maior ou igual a 2 ($n = 5$).

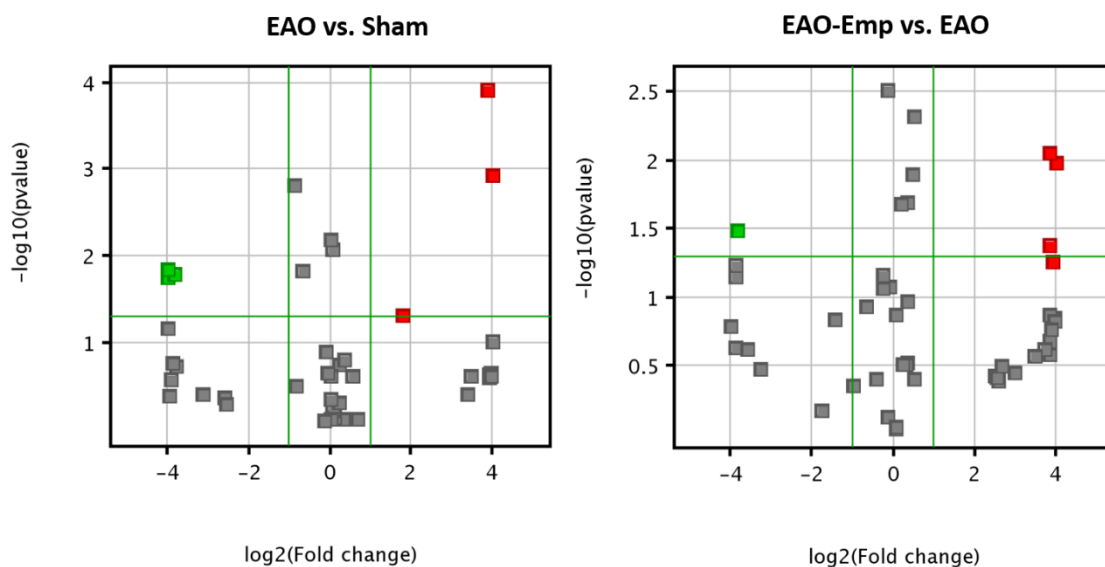


Figura 3: Volcano plots. Número de metabólitos expressos diferencialmente – os mais abundantes mostrados em vermelho e os menos abundantes em verde

Dificuldades encontradas durante a execução do projeto

Westen blot

No tecido cardíaco, enfrentamos dificuldades na realização de Western blot para proteínas com massa molecular acima de 100 kDa. Proteínas de maior tamanho apresentam maior dificuldade de transferência. Para a proteína iNOS, realizamos dois tipos de transferência, úmida e semi-seca, utilizando dois tipos diferentes de equipamentos, mas não conseguimos detectar a proteína de forma que permitisse a sua quantificação. Quando o processo de transferência era prolongado, a proteína de normalização, GAPDH, não permanecia na membrana. Assim, não foi possível quantificar a proteína iNOS.

Na cultura de células, enfrentamos dificuldades na padronização da quantidade de proteína para a execução da técnica. Após padronizarmos com 27 µg de proteína por amostra, encontramos grande dificuldade em detectar as proteínas fosforiladas. Acreditamos que os anticorpos utilizados não foram eficientes para marcar essas proteínas nos experimentos com células H9C2. Após a marcação com anticorpos, as imagens apresentavam sinais de amostras degradadas (Figura 1), embora a proteína de normalização, GAPDH, aparecesse normalmente (Figura 2). A quantificação da expressão das proteínas JNK total, glutathiona peroxidase e catalase também não foi possível, uma vez que os blots apresentaram qualidade insatisfatória, comprometendo a fidedignidade dos resultados (Figura 3). Diversas tentativas foram realizadas para melhorar a qualidade dos blots dessas proteínas. Acreditamos que o problema possa estar nos anticorpos utilizados.

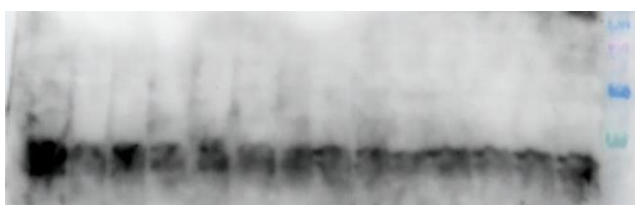


Figura 1: pJNK



Figura 2: GAPDH

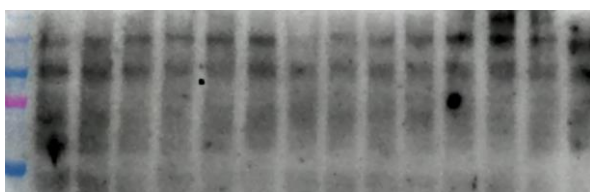


Figura 3: Glutathiona peroxidase

Imunofluorescência

Tivemos muitas dificuldades na preparação das lâminas com cortes do ventrículo esquerdo para fazer a imunofluorescência, pois o tecido frequentemente se rompia. Após a marcação com o anticorpo NRF2, as imagens apresentaram um elevado nível de *background*, tornando difícil distinguir as marcações. Dessa forma, não foi possível quantificar os resultados devido à baixa qualidade das imagens. Alguns outros anticorpos foram testados, como o NLRP3, mas também não apresentaram boa qualidade.

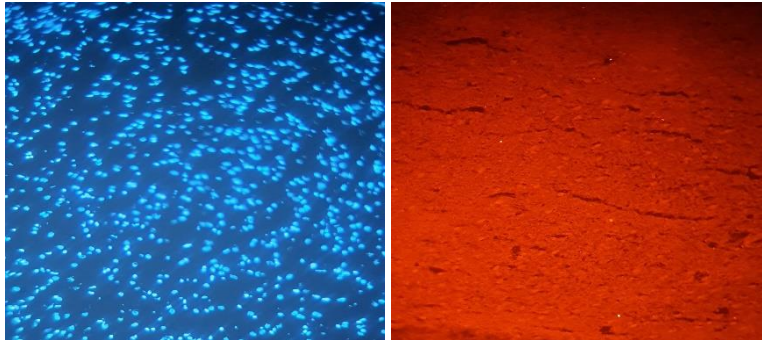


Figura 4: DAPI e NRF2